DOI:10.11931/guihaia.gxzw201906015

产壳聚糖酶内生真菌的筛选、鉴定及酶活力初步研究

金秋珠[1,2,3]，颜桢灵[1,2,3]，黄植清[1,2,3]，袁海莹[1,2,3]，刘广华[1,2,3]，农小霞[1,2,3]，李鑫[1,2,3]，骆海玉[1,2,3*]

（1. 珍稀濒危动植物生态与环境保护教育部重点实验室，广西 桂林 541006；2. 广西珍稀濒危动物生态学重点实验室，广西 桂林 541006；3. 广西师范大学 生命科学学院，广西 桂林 541006）

摘要：植物内生真菌是挖掘不同类型壳聚糖酶及发现新酶的资源宝库。本研究从 122 株柑橘和血散薯内生真菌中筛选能产生壳聚糖酶的菌株，对其进行鉴定，初步研究酶活力影响因素，为后期其酶学性质及产壳聚糖酶内生真菌与宿主植物病害防御互作关系的研究奠定基础。通过透明圈法初筛结合液体发酵法进行复筛，得到两株可产生壳聚糖酶的内生真菌 Stdif9 和 Stdif9-4，并发现 Stdif9-4 最高酶活力（0.968 U mL^{-1}）显著高于 Stdif9（0.780 U mL^{-1}）。采用形态学和分子生物学结合的方法将菌株 Stdif9-4 鉴定为青霉属菌株，即 *Penicillium* sp. Stdif9-4。通过 DNS 试剂法初步研究影响该菌株产壳聚糖酶活力的因素，结果表明，不同培养时间对菌株壳聚糖酶活力具有显著影响，在培养 96 h 时，壳聚糖酶活力达到最大值。9 种金属离子对菌株的酶活力具有不同影响，其中 Mn^{2+}和 Ca^{2+}对壳聚糖酶活力具有明显的激活作用；Ag^{+}、Zn^{2+}、Cd^{2+}、Ba^{2+}和 Fe^{3+}对壳聚糖酶活力具有不同程度的抑制作用，并且 Ag^{+}的抑制作用最为显著；K^{+}和 Na^{+}对壳聚糖酶活力无显著影响。不同培养代数菌株产酶活力无显著差异，说明其产酶活力稳定。

关键词：植物内生真菌，壳聚糖酶，酶活力，青霉属，血散薯

中图分类号：Q939.99　　　　**文献标识码：**A

Study on the screening and identification of chitosanase-producing endophytic fungi as well as their chitosanase activity

JIN Qiuzhu[1,2,3], YAN Zhenling[1,2,3], HUANG Zhiqing[1,2,3], YUAN Haiying[1,2,3], LIU Guanghua[1,2,3], NONG Xiaoxia[1,2,3], LI Xin[1,2,3], LUO Haiyu[1,2,3*]

（1. *Key Laboratory of Ecology of Rare and Endangered Species and Environmental Protection, Ministry of Education*, Guilin 541006, Guangxi, China; 2. *Guangxi Key Laboratory of Rare and Endangered Animal Ecology*, Guilin 541006, Guangxi, China; 3. *College of Life Science*, *Guangxi Normal University*, Guilin 541006, Guangxi,

---

基金项目：广西自然科学基金（2016GXNSFBA380049，2018GXNSFAA281013）；广西中青年教师基础能力提升项目（2017KY0080）；广西珍稀濒危动物生态学重点实验室研究基金（GKN. 17-A-02-02）；广西师范大学生态学博士点建设经费资助（EDPC 2018002）；2019 年广西壮族自治区大学生创新创业训练计划项目（201910602244）[Supported by Natural Science Foundation of Guangxi, China (2016GXNSFBA380049, 2018GXNSFAA281013); Youth and Middle-aged Basic Ability Promotion Project (2017KY0080); Guangxi Key Laboratory of Rare and Endangered Animal Ecology, Guangxi Normal University (GKN. 17-A-02-02); Ecological Doctoral Program Construction of Guangxi Normal University (EDPC 2018002); Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students of Guangxi (201910602244)]。

作者简介：金秋珠（1998-），女，广东怀集人，学士，主要从事天然产物开发与利用研究，(E-mail) jinqiuzhu@126.com。

***通信作者：**骆海玉，博士，讲师，主要从事生物源活性物质与病害防控，(E-mail) luohaiyu69@163.com。

China）

Abstract: Endophytic fungi are good sources for exploring high diversity of chitosanase and discovering new enzymes. In this study, chitosanase-producing strains were screened and identified from 122 endophytic fungi associated with citrus and *Stephania dielsiana*, and the factors affecting the activity of chitosanase were preliminarily studied, in order to provide an experiment basis for further study on the enzymatic properties and the interaction between chitosanase-producing endophytic fungi and host plant resistance to diseases. Two endophytic fungi Stdif9 and Stdif9-4 were found to produce chitosanase by transparent circle method and liquid fermentation method. The highest activity of Stdif9-4 (0.968 U mL^{-1}) was significantly higher than that of Stdif9 (0.780 U mL^{-1}). Stdif9-4 was identified as *Penicillium* sp. Stdif9-4 by morphological method and sequencing analysis of ITS gene. The factors affecting on the chitosanase activity were studied by DNS reagent method. The results showed that the chitosanase activity reached maximum at 96 h of cultivation. In addition, among the nine metal ions, Mn^{2+} and Ca^{2+} had obvious activation effect on chitosanase activity. Ag^{+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Ba^{2+} and Fe^{3+} had different inhibitory effect on chitosanase activity, and Ag^{+} had more significant inhibitory effect. K^{+} and Na^{+} did not show significant effect on enzyme activity. There was no significant difference in enzyme activity between different cultured generations, which indicated that the enzyme activity was stable.

Key words: plant endophytic fungi, chitosanase, enzyme activity, *Penicillium*, *Stephania dielsiana*

自 1973 年 Monaghan et al.（1973）首先报道了壳聚糖酶（chitosanase）是一种不同于几丁质酶的新酶以来，壳聚糖酶的基础与应用研究已成为目前的研究热点之一，引起越来越多研究者的关注。壳聚糖酶不水解胶态几丁质，但能够水解完全脱乙酰化的壳聚糖，所以该酶被认为是专一性水解线性壳聚糖的酶，主要存在于真菌、细菌及植物中（鲁晶娣等，2018）。近年来，大量研究表明，壳聚糖酶可以作为生物防治剂，能提高植物的抗病能力，与细胞壁的降解、营养代谢等均有密切相关，在回收利用甲壳素中的氮和碳素等方面也起着重要的作用（Kouzai et al.，2012；Thadathil & Velappan，2014；鲁晶娣等，2018；Radhakrishnan et al.，2017）。此外，其水解产物壳寡糖具有抗菌、抗肿瘤、抗氧化、促进伤口愈合等多种独特的生理活性和功能，在医药、食品、化妆品等领域中具有广阔的应用前景（Aam et al.，2010；Park & Kim，2010；Jaiswal et al.，2019）。

不同微生物来源的壳聚糖酶的种类及性质具有较大差异。已有研究表明，植物内生真菌是探索不同种类壳聚糖酶及发现新酶的资源宝库（Rajulu et al.，2011；Venkatachalam et al.，2015）。目前对植物内生真菌壳聚糖酶的研究仍然极少。植物内生真菌是指在其生活史中的某一阶段或全部阶段生活生存在健康植物体各类组织内而不引起宿主植物产生明显病害症状况、与宿主植物互惠共生的真菌（Abdalla & Matasyoh，2014）。Rajulu et al.（2011）首次从陆生植物内生真菌中筛选产几丁质修饰酶的菌株，发现其中 37%的内生真菌可产生多种类型的壳聚糖酶。Venkatachalam et al.（2015）从海藻和海草的 117 株内生真菌中发现 41%的菌株产生的壳聚糖酶可水解脱乙酰度为 56%的壳聚糖，66%的菌株产生的壳聚糖酶可水解脱乙酰度为 38%的壳聚糖，56%的菌株产生的壳聚糖酶可水解脱乙酰度为 1.6%的壳聚糖。并且，Rajulu et al.（2011）和 Venkatachalam et al.（2015）的研究均发现来源于不同植物的同种内生菌的酶具有高度多样性。

植物中普遍含有内生真菌，种类繁多。从植物内生真菌中筛选产壳聚糖酶菌株将有利于发现种类丰富多样的壳聚糖酶，也将有利于水解产生多种不同类型的壳寡糖，为农业、医药

业及食品工业等提供更多有利资源。本研究从柑橘和血散薯的 122 株内生真菌中筛选产壳聚糖酶的菌株，初步研究酶活力影响因素，为后续进一步研究其酶学特性和功能、明确产壳聚糖酶内生真菌与宿主植物互作关系等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物内生真菌

122 株植物内生真菌为广西师范大学珍稀濒危动植物生态与环境保护教育部重点实验室化学生态实验室前期从健康柑橘（*Citrus* spp.）和血散薯（*Stephania dielsiana*）植株中分离得到。柑橘样品采自广西桂林（110°19′44″ E、25°16′13″ N，110°16′36″ E、25°11′5″ N）、梧州（111°1′18″ E、23°29′46″ N）；血散薯采自广西来宾市金秀瑶族自治县（109º59′34″ E、24º16′10″ N）。

1.2 仪器与试剂

主要仪器：超净工作台 ZHJH-C1112C，上海智城；恒温培养箱，韶关泰宏医疗器械；恒温摇床 LYZ-2102C，上海龙跃；生物显微镜 DM3 000，德国徕卡；紫外可见光分光光度计 UV-1 200，上海美普达。

主要药品试剂：DNS 试剂（购自优品实验室），壳聚糖（分子量 29 万，脱乙酰度 95%，购自浙江玉环澳兴甲壳素有限公司），盐酸溶液（购自西陇科学股份有限公司），氢氧化钠（购自西陇科学股份有限公司），金属离子盐（所用的离子 Na^{+}、K^{+}、Ca^{2+}、Mn^{2+}、Zn^{2+}、Cd^{2+}、Ba^{2+}和 Fe^{3+}均为氯盐，Ag^{+}为 $AgNO_3$）。

1.3 培养基

1.3.1 活化培养基

用于菌种从低温保存条件转到室温条件的活化适应，采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基（PDA）：去皮的马铃薯 20%，葡萄糖 2%，琼脂 2%，pH 7.0，121 ℃高温高压灭菌 20 min。

1.3.2 种子培养基

种子液同 1.3.1，仅不添加琼脂。

1.3.3 产壳聚糖酶菌株筛选培养基

参考张涛（2005）的方法，配制初筛和复筛诱导培养基，具体如下：

A 组分：1%胶体壳聚糖，pH 5.6。

B 组分：酵母粉 0.1%，K_2HPO_4 $3H_2O$ 0.3%，KH_2PO_4 0.2%，$MgSO_4$ $7H_2O$ 0.14%，NaCl 0.1%，KCl 0.1%，$CaCl_2$ 0.02%，琼脂 2%。。

C 组分：土豆汁 20%，葡萄糖 0.2%，蛋白胨 0.5%，酪蛋白 0.2%，酵母浸膏 0.5%，pH 5.6。

以上 A、B、C 组分均单独灭菌。其中，将 A、B 两溶液等体积混合制得初筛固体培养基；将 A、C 两溶液等体积混合制得复筛液体发酵培养基。

1.4 产壳聚糖酶菌株筛选

1.4.1 初筛（透明圈法筛选）

在超净工作台中，用无菌打孔器（直径 4 mm）在已活化的内生真菌菌落边缘取菌饼，转接至初筛培养基制成平板上，每皿接 1 块菌饼，设置 3 个重复，于 28 ℃培养，每天观察菌株生长情况，并在有透明圈产生时，采用十字交叉法测量相应透明圈直径（D）和菌落直径（d），记录数据并拍照，计算 D/d 比值。挑选产透明圈明显的菌株，进一步用摇瓶发酵检测酶活。

1.4.2 复筛

在超净工作台中，向装有 100 mL 种子培养基的三角瓶（250 mL）中转接 3 块活化的菌饼，设置 3 个重复，28 ℃、150 r min^{-1} 振荡培养 3 d，获得种子液。用移液枪吸取 2 mL 种

子液接入装有 100 mL 复筛培养基的三角瓶（250 mL）中，设置 3 个重复，28 ℃、150 r min^{-1} 振荡培养 3 d 后，测定壳聚糖酶活力。

1.5 菌株鉴定

采用形态学结合分子生物学的方法对产壳聚糖酶的菌株进行鉴定。形态学鉴定菌株主要是通过不同的培养基（CA、PDA、CYA及G25N）对内生真菌进行培养，参考《真菌鉴定手册》（魏景超，1979）、《中国真菌志》（孔华忠，2007）及相关文献对其进行初步鉴定。鉴定特征包括菌落大小、形态、生长速率、边缘特征、菌落及培养基基质颜色，以及菌落在显微镜下的特征（如菌丝有无分隔、分支，分生孢子形态、大小，产孢结构特征等）。分子生物学鉴定菌株主要是利用真核生物在rDNA的ITS区段具有保守性和特异性序列的特性，以真菌通用引物ITS1和ITS4扩增菌株ITS碱基序列，委托北京六合华大基因科技有限公司武汉分公司进行检测纯化及测序。将获得的测序结果与NBCI数据库中的序列进行BLAST比对，选择相似度较高，亲缘关系近的菌株比对，并用MEGA X软件，对ITS碱基序列进行聚类分析，Bootstrap进行自展次数为1 000的置信度检测，根据系统发育树中的组群关系对菌株进行分类。

1.6 壳聚糖酶活力测定

1.6.1 氨基葡萄糖标准溶液

准确称取 0.863 g 氨基葡萄糖盐酸盐（105 ℃烘至恒重），置于小烧杯中，加少量蒸馏水溶解后，转移到容量瓶中，用蒸馏水定容至 1 000 mL，混匀，配制成 4 μmol·mL^{-1} 氨基葡萄糖标准溶液，置于 4 ℃冰箱中保存备用。

1.6.2 氨基葡萄糖标准曲线绘制

取 6 支洗净的 10 mL 试管，依次加入 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 浓度为 4 μmol·mL^{-1} 的氨基葡萄糖标准溶液，均加蒸馏水至 1 mL，再分别加入 1 mL DNS 试剂，放入 100 ℃的水中反应 10 min 后取出。冷却后，加蒸馏水定容至 10 mL，混匀。在 520 nm 波长处，以 0 号管调节零点，测定其它号试管溶液的吸光值。重复 3 次测量，计算出每支试管吸光值的平均值。

1.6.3 DNS 法测壳聚糖酶活力

参考胡远亮（2007）和刘昌燕等（2009）的方法，具体操作如下：取 0.5 mL 发酵上清液和 0.5 mL 1%胶体壳聚糖溶液，在 50 ℃下保温 60 min。然后向试管中加入 1 mL DNS 试剂终止反应，并转至沸水中反应 10 min。反应结束后用流动自来水进行降温。最后，向试管中分别加入蒸馏水至每管溶液体积为 10 mL。以煮沸失活的酶液作为对照，用分光光度计测量 520 nm 处的吸光值（OD_{520}），根据氨基葡萄糖标准曲线方程计算出其对应的氨基葡萄糖浓度。并按照以下公式计算酶活力：即酶活力=（测定样组的还原糖量-对照样组的还原糖量）×2（稀释倍数）/60（时间）。酶活力定义为：每毫升发酵液每分钟产生 1 μmol 还原糖所需的酶量为一个酶活力单位（U）。

1.7 菌株 Stdif9-4 产酶曲线测定

参照毛贵珠等（2012）的方法，并进行适当改良，按照 1.4.2 的操作方法，将种子液接入 250 mL 三角瓶中，每菌接 3 瓶，28 ℃、150 r min^{-1} 振荡培养，分别于 24 h、48 h、72 h、96 h 和 120 h 取发酵液离心（4 000 r min^{-1}，15 min），按照 1.6.3 方法测定上清液酶活力。

1.8 金属离子对菌株 Stdif9-4 酶活力的影响

分别配制浓度为 100 mmol L^{-1} 的金属离子（Na^{+}、K^{+}、Ag^{+}、Ca^{2+}、Mn^{2+}、Zn^{2+}、Cd^{2+}、Ba^{2+}和 Fe^{3+}）溶液，然后分别向混有 0.5 mL 发酵上清液和 0.5 mL 1%胶体壳聚糖溶液的试管中加入上述金属离子溶液 0.1 mL。按照 1.6.3 的方法测定酶活，每个样品做 3 个平行实验。以不加金属离子的空白对照组酶活力为 100%，在金属离子存在条件下的实验组酶活力相对于空白对照组酶活力的比例即为添加金属离子后的相对酶活力（高剑锋等，2012）。即相对

酶活力=实验组酶活力/空白对照组酶活力。

1.9 菌株 Stdif9-4 酶活力稳定性测定

将菌株连续传代培养 5 代，分别测定每代菌株产壳聚糖酶活力，以判断菌株产酶活力是否稳定。从保种管内挑出 Stdif9-4 菌丝进行活化，作为第一代，培养 3 d 即转接至新的 PDA 培养基内，新转接菌株继续培养 3 d，作为第二代，再转接，以此类推，至第五代。

2 结果与分析

2.1 氨基葡萄糖标准曲线方程

建立的氨基葡萄糖标准曲线方程为 y=0.164 1x-0.003 3（R^2=0.999 1），其中 x 为氨基葡萄糖浓度，y 为不同浓度的氨基葡萄糖溶液的吸光值。

2.2 产壳聚糖酶内生真菌筛选

利用透明圈法，通过大量筛选，初步确定透明圈直径/菌落直径较大的 2 株内生真菌 Stdif9 和 Stdif9-4（分离自血散薯块根）为产壳聚糖酶较好的菌株。进一步测定 2 株内生真菌 Stdif9 和 Stdif9-4 发酵液（培养 3 d）的壳聚糖酶活力，结果如表 1 所示。发酵培养 3 d 的内生真菌 Stdif9 和 Stdif9-4 对 95%脱乙酰度壳聚糖有较好的酶解作用，其壳聚糖酶活力分别达到 0.780 U mL^{-1} 和 0.968 U mL^{-1}，Stdif9-4 壳聚糖酶活力显著高于菌株 Stdif9-4 的。

表 1 2 株产壳聚糖酶菌株及其酶活力

Table 1 Two strains producing chitosanase and their enzyme activities

内生真菌 Endophytic fungi	透明圈与菌落直径比值 Ratio of transparent circle to colony diameter			发酵液酶活力 Enzyme activity of fermentation broth（U mL^{-1}）（3 d）
	3 d	5 d	10 d	
Stdif9	1.64Aa	1.59ABa	1.41Bb	0.780b
Stdif9-4	1.71Aa	1.65Ba	1.53Ca	0.968a

注：大写字母为每行数据结果差异性比较，小写字母为每列数据结果差异性比较。不同字母代表在 0.05 水平上的差异显著。

Note: Capital letters denote differences in each row of data, and lower-case letters denote the differences in each column of data. Different letters mean significant differences at 0.05 level.

2.3 2 株内生真菌产壳聚糖酶活力曲线

分别测定内生真菌 Stdif9 和 Stdif9-4 在摇培 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h 和 168 h 后的产酶活力，以确定其产壳聚糖酶活力最佳培养时间，结果如图 1 所示。2 株内生真菌在前 48 h 产酶活力均较低，48 h 后产酶活力迅速增加，并均在 96 h 时产酶活力达到最大值，96 h 之后产酶活力开始逐渐降低。从酶活力曲线可知，在不同培养时间中，Stdif9-4 菌株产酶活力均高于 Stdif9。因此，后续选取 Stdif9-4 进行进一步研究。

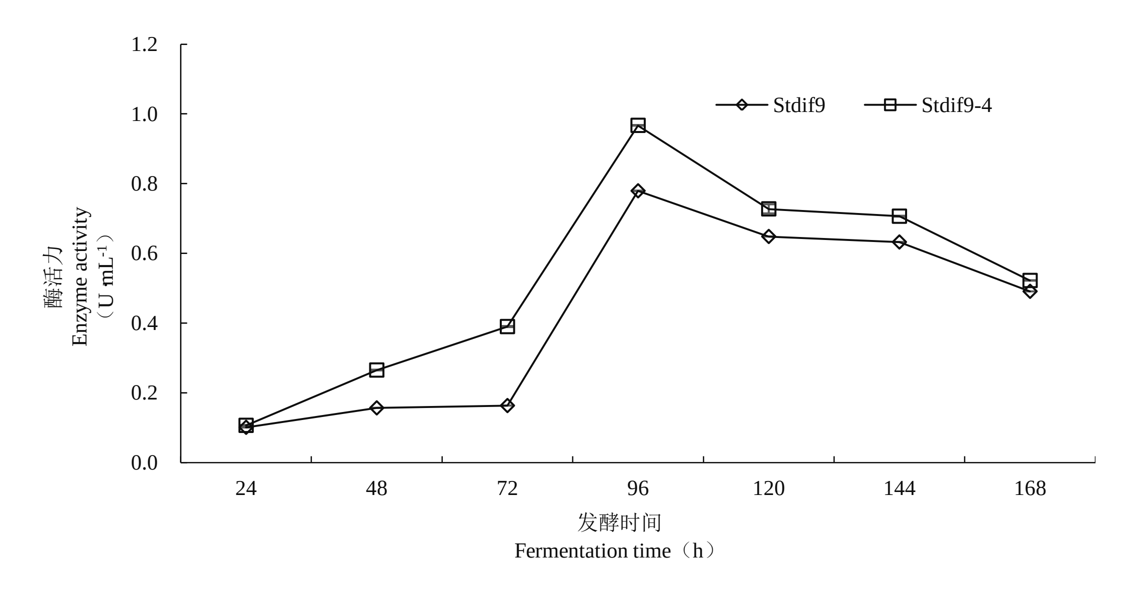


图 1 2 株内生真菌产壳聚糖酶活力曲线

Fig.1 Activity curve of chitosanase produced by two endophytic fungi

2.4 内生真菌 Stdif9-4 的鉴定

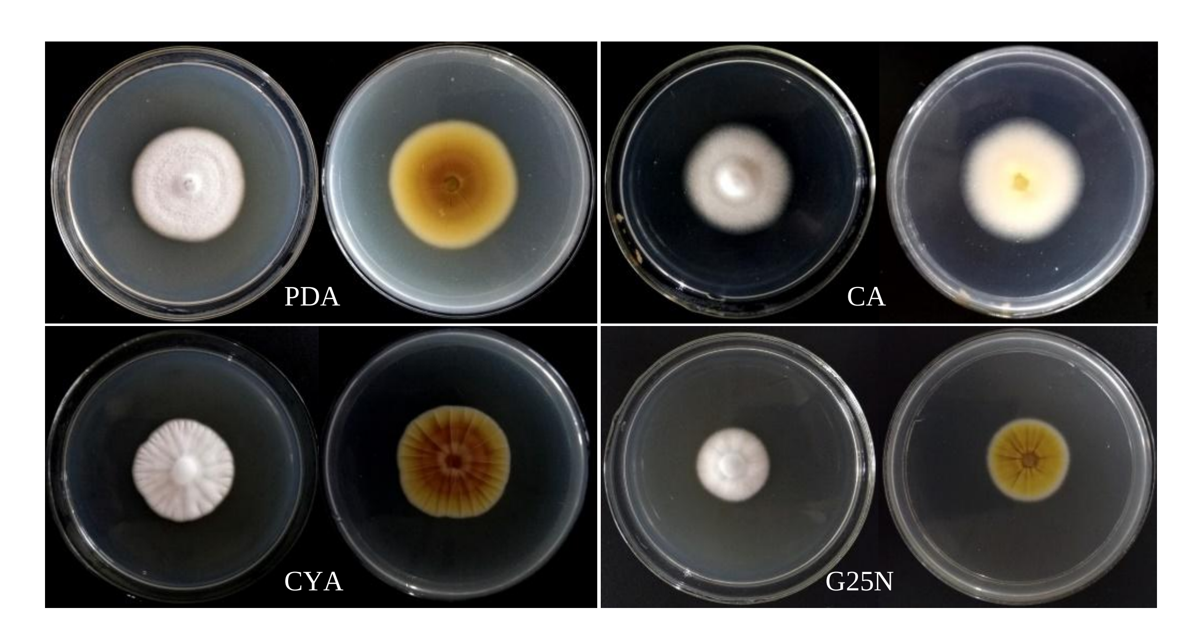
采用形态学和分子生物学方法对内生真菌 Stdif9-4 进行鉴定。参考《中国真菌志》（孔华忠，2007），根据显微形态图（图 3），其分生孢子梗上只有一个分枝点，此分枝点上为单轮生的帚状枝；分生孢子梗和分子孢子表面平滑；分生孢子球形或近球形。结合 Stdif9-4 在不同培养基上的菌落直径（表 2）和菌落形态（图 2）初步确定内生真菌 Stdif9-4 为青霉属（*Penicillium*）菌株。结合分子生物学鉴定，将其测序结果与 GenBank 中的序列进行比对，发现其 ITS 序列与 *Penicillium* sp.的相似性高达 100%。因此，将 Stdif9-4 鉴定为 *Penicillium* sp. Stdif9-4（GenBank 登录号为 MN238849）。

表 2 活性菌株菌落形态及生长直径

Table 2 Colony morphology and growth diameter of the active strain

培养基 Culture medium	菌落特征 Colony characteristics		直径 Diameter（cm）
	菌落正面形态 Frontal morphology of colonies	菌落背面形态 Background morphology of colonies	
PDA	菌落表面呈白色，质地为短绒毛状，少量同心环，边缘整齐 White colony surface, short villous texture, a few concentric rings, neat edges	圆心周围颜色较深，菌落外围颜色变为黄绿色，具有过渡同心环带 The color around the center is darker, and the surrounding color of the colony turns to yellow-green, with a transition concentric ring	4.29
CA	菌落表面呈白色，质地为短绒毛状，边缘整齐 White colony surface, short villous texture, neat edge	白色至淡黄色 White to light yellow	4.00
CYA	菌落表面呈白色，质地为短绒毛状，有大量放射状沟纹，边缘整	黄褐色，有少量同心环，环纹颜色较深，有大量放射状皱纹	3.94

	齐 White colony surface, short villous texture, a large number of radial grooves, neat edges	Yellow-brown, with a few dark concentric rings and a large number of radial wrinkles	
G25N	菌落表面呈白色，质地为短绒毛状，边缘整齐 White colony surface, short villous texture, neat edge	黄绿色，菌落边缘呈白色 Yellow-green colony with white edge	2.69



注：以上为菌株 Stdif9-4 在不同培养基上培养 7 d 的菌落形态图。

Note: The above is the colony morphology of strain Stdif9-4 cultured on different media for 7 d.

图 2 Stdif9-4 在不同培养基上的菌落形态图

Fig.2 Colony morphology of Stdif9-4 on different media

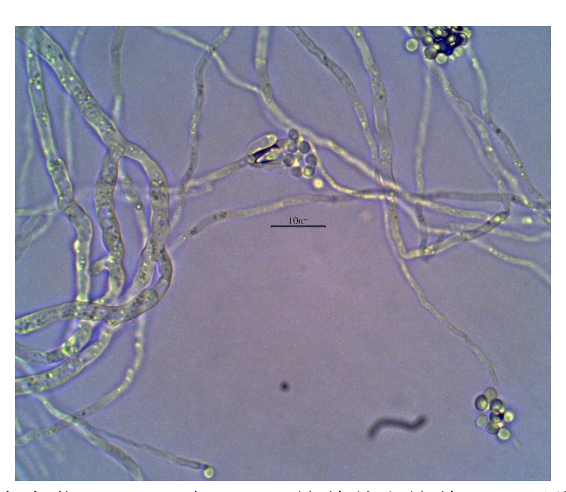


图 3 内生真菌 Stdif9-4 在 G25N 培养基上培养 30 d 显微形态图

Fig.3 Microscopic morphology of Stdif9-4 culturing on G25N medium for 30 d

2.5 金属离子对内生真菌 Stdif9-4 壳聚糖酶活力影响

本文在确定 Stdif9-4 壳聚糖酶活力最高的发酵时间（96 h）的基础上，测定了 9 种金属离子（Na^{+}、K^{+}、Ag^{+}、Ca^{2+}、Mn^{2+}、Zn^{2+}、Cd^{2+}、Ba^{2+}和 Fe^{3+}，浓度均为 100 mmol • L^{-1}）对酶活力的影响，结果如表 3 所示。Mn^{2+}和 Ca^{2+}对 Stdif9-4 所产的壳聚糖酶活力具有明显的激活作用；Ba^{2+}和重金属离子 Ag^{+}、Zn^{2+}、Cd^{2+}、Fe^{3+}对壳聚糖酶活力都有不同程度的抑制作用，其中 Ag^{+}的抑制作用最为显著。K^{+}和 Na^{+}对壳聚糖酶活力无显著影响。

表 3 不同金属离子对内生真菌 Stdif9-4 壳聚糖酶活力影响

Table 3 Effects of different metal ions on chitosanase activity of endophytic fungus Stdif9-4

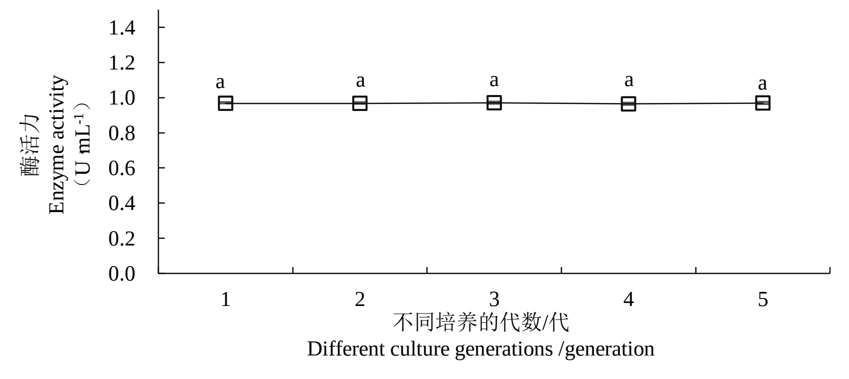
金属离子 Metal ion	CK	Na^{+}	K^{+}	Ag^{+}	Ca^{2+}	Mn^{2+}	Zn^{2+}	Cd^{2+}	Ba^{2+}	Fe^{3+}
相对酶活力 Relative enzyme activity（%）	100.0c	100.2c	101.4c	57.9g	108.2b	172.9a	84.5e	85.2e	92.8d	74.1f

注：CK 表示对照，每行数据后面不同字母代表在 0.05 水平上的差异显著。

Note: CK denotes the control group. The different letters after each row of data represent significant differences at 0.05 level.

2.6 内生真菌 Stdif9-4 产壳聚糖酶稳定性测定

将内生真菌 Stdif9-4 转接继代培养 5 代，分别测定相应发酵液壳聚糖酶活性，发现酶活性无显著差异（图 4）。结果表明该菌株产酶活力比较稳定。



注：相同字母代表在 0.05 水平上无显著差异。

Note: The same letter represents no significant differences at 0.05 level.

图 4 内生真菌 Stdif9-4 产壳聚糖酶活力稳定性

Fig.4 Stability of chitosanase produced by endophytic fungus Stdif9-4

3 讨论与结论

通过平板初筛和液体复筛，从 122 株内生真菌中筛选到了 2 株产壳聚糖酶的菌株。采用形态学结合分子生物学的方法对其中产酶活力较高的菌株进行鉴定，将其归为青霉属。目前，人们从植物内生真菌中筛选产壳聚糖酶菌株的研究较少，主要还是从土壤、海洋等环境中进行筛选（Zitouni et al.，2017；Fukamizo & Shinaya，2019；Chien et al.，2018），而且发现的产酶菌株大多数为青霉属（*Penicillium*）或曲霉属（*Aspergillus*）（曾嘉，2002；郑连英和隋斯光，2004；卓少玲，2012；单秋实，2015）。本研究筛选到的产壳聚糖酶的内生真菌 *Penicillium* sp. Stdif9-4 也为青霉属菌株，分离自我国重要药用植物血散薯块根。由于不同来源的壳聚糖酶的酶学性质往往有较大差异，*Penicillium* sp. Stdif9-4 来源于药用植物，其特殊的生境是否会使得其壳聚糖酶的结构、功能有别于其他环境菌株，其对壳聚糖的作用类型是

内切型还是外切型等，后期还需进一步研究。此外，不同培养基及不同营养成分配比对不同菌株的生长及酶的诱导往往有不同程度的影响，在进行初筛的过程中，由于只用了一种选择培养基，这很可能会导致漏筛一部分产壳聚糖酶的菌株。因此，后期可尝试多种含壳聚糖的培养基进行筛选。

发酵时间对壳聚糖酶活力有显著影响。*Penicillium* sp. Stdif9-4 产壳聚糖酶活力在前 48 h 均较低，48 h 后迅速增加，并在 96 h 时达到最大值，随后逐渐降低。这与张翔等（2018）、张子瑞（2016）报道的结果相似。与之相应的，王钦宏和蔡静平（2000）发现产酶活力最高时，培养液中活菌数也达到了最高水平，并确定 3 d 为适宜的收获时间。推测可能因为在发酵初期，培养基内的营养物质充裕，菌体大量繁殖，产生大量的壳聚糖酶，后期由于营养物质的减少及菌体进入衰亡期，壳聚糖的产生也随之减少（熊妍妍等，2018）。本文仅研究了发酵时间对壳聚糖酶活力的影响，接种量、培养基各营养成分（如碳源、氮源等）以及培养条件（如温度、pH 等）等因素也均可影响壳聚糖酶活力，后期可利用单因素实验结合正交实验或响应面分析等进行综合分析，以确定最有效促进产壳聚糖酶活力提高的条件。

大部分壳聚糖酶活性均可受金属离子的影响。本研究使用 8 种氯盐分别提供了 8 种金属离子（Na^{+}、K^{+}、Ca^{2+}、Mn^{2+}、Zn^{2+}、Cd^{2+}、Ba^{2+}及 Fe^{3+}）和 $AgNO_3$ 提供 Ag^{+}，考查不同金属离子对酶活力的影响。其中，Mn^{2+}和 Ca^{2+}对 Stdif9-4 壳聚糖酶活力具有明显的激活作用。相似的，单秋实（2015）研究发现金属离子 Mn^{2+}、Ca^{2+}对来源于土壤的青霉（*Penicillium* sp. QS7）壳聚糖酶活力也具有促进作用；卓少玲（2012）也发现 Ca^{2+}对来源于土壤的青霉（*Penicillium* sp. M-2）壳聚糖酶活力具有促进作用。并且，Mn^{2+}和 Ca^{2+}对大多数微生物来源的壳聚糖酶活性具有激活作用（曾嘉，2002；郝日光，2005；段妍，2006）。Ba^{2+}和重金属离子 Ag^{+}、Zn^{2+}、Cd^{2+}、Fe^{3+}对壳聚糖酶活力具有不同程度的抑制作用，K^{+}和 Na^{+}对壳聚糖酶活力无显著影响。这与大多数微生物来源的壳聚糖酶一致（逄玉娟，2004；段妍，2006；游清徽，2006；王艳君等，2012；张翔等，2018），但也有部分金属离子对不同来源的壳聚糖酶活力起着相反的作用，如在单秋实（2015）的报道中，Zn^{2+}对来源于土壤的青霉（*Penicillium* sp. QS7）壳聚糖酶活力具有促进作用。金属离子对酶的影响机制，可能与金属离子和底物壳聚糖形成稳定的复合物有关（陈小娥，2004）；或金属离子通过参与壳聚糖酶活性中心的构建，结合酶活性中心以外的部位，增大酶与底物之间的亲和力，使酶活力得到增强（Chen et al.，2005；杨立红等，2013）；或由于金属离子通过螯合作用，影响酶的构象，干扰酶对底物的降解作用，从而导致酶活力下降（王艳君等，2012）。并且，不同作用条件如温度、pH、酶的浓度、底物浓度以及金属离子本身的浓度都会影响其作用效果。后期应对以上作用条件进行优化，并进一步研究不同金属离子对菌株壳聚糖酶活力影响机制。

综上，本研究从血散薯内生真菌中筛选到产壳聚糖酶活力稳定的青霉属菌株，并初步研究了影响酶活力的因素。后期将进一步研究壳聚糖酶的酶学性质，对菌株产壳聚糖酶活力的最佳培养条件进行优化，进一步明确金属离子促进壳聚糖酶活力的最佳浓度、复合效应及其作用机制，并测定壳聚糖酶及其水解产物的抗菌活性或诱导活性，及探究其与宿主植物病害防御互作关系。

参考文献：

AAM BB, HEGGSET EB, NORBERG AL, et al., 2010. Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine[J]. Mar Drugs, 8(5): 1482-1517.

ABDALLA MA, MATASYOH JC, 2014. Endophytes as producers of peptides: An overview about the recently discovered peptides from endophytic microbes[J]. Nat Prod Bioprospect, 4(5): 257-270.

CHIEN D, THi T, VAN N, et al., 2018. Reclamation of marine chitinous materials for chitosanase production via microbial conversion by *Paenibacillus macerans*[J]. Mar Drugs, 16(11):

429-451.
CHEN XE, 2004. Study on the characterization and mechanism of chitosanases from *Aspergillus* sp.[D]. Wuxi: Jiangnan University. [陈小娥，2004．曲霉产壳聚糖酶酶学性质及作用机理研究[D]．无锡：江南大学.]
CHEN XE, XIA WS, YU XB, 2005. Purification and characterization of two types of chitosanase from *Aspergillus* sp. CJ22-326[J]. Food Res Int, 38(3): 315-322.
DUAN Y, 2006. Study on optimal fermentation conditions of a chitosanase-producing bacterium, purification and characterization of the chitosanase[D]. Qingdao: Ocean University of China. [段妍，2006. 产壳聚糖酶菌株的发酵条件优化、壳聚糖酶的分离纯化与酶学性质研究[D]．青岛：中国海洋大学.]
FUKAMIZO T, SHINAYA S, 2019. Chitin/chitosan-active enzymes involved in plant-microbe interactions[J]. Adv Exp Med Biol, 1142(12): 253-272.
GAO JF, LI WX, LI HL, et al., 2012. Screening and enzymatic characteristic of a cellulase producing strain[J]. Hubei Agric Sci, 51(8): 1566-1568. [高剑锋，李文鑫，李汇龙，等，2012．一株产纤维素酶菌株的筛选及酶学性质[J]．湖北农业科学，51(8)：1566-1568.]
HAO RG, 2005. Breeding of chitosanase-producing strains, optimization of fermentation conditions and study on enzymatic properties[D]. Qingdao: Ocean University of China. [郝日光，2005．产壳聚糖酶菌株的选育、发酵条件优化和酶学性质的研究[D]．青岛：中国海洋大学.]
HU YL, 2007. Screning of chitosanase-producing mutant and study on its fermentation technology[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. [胡远亮，2007．产壳聚糖酶菌株的选育及产酶发酵工艺研究[D]．武汉：华中农业大学.]
LIU CY, JIN L, LIU YY, et al., 2009. Screening of chitosanase-producing fungi from soil[J]. Chin J Microecol, 21(9): 776-778. [刘昌燕，金玲，刘颖颖，等，2009. 土壤中产壳聚糖酶真菌的筛选[J]. 中国微生态学杂志，21(9)：776-778.]
LU JT, WEI PQ, ZHANG XM, et al., 2018. Research progress of chitosanase[J]. Chin Cond, 43(12): 168-173. [鲁晶娣，韦盘秋，张兴猛，等，2018．壳聚糖酶的研究进展[J]．中国调味品，43(12):168-173.]
JAISWAL S, TRIPATHI P, SINHA S, 2019. Biocatalytic production of hetero-chitosan oligosaccharides as anti-oxidants[J]. Sustain Agric Rev, 35, 125-146.
KONG HZ, 2007. Flora fungorum sinicorum[M]. Beijing: Science Press: 35： 112-115. [孔华忠，2007．中国真菌志[M]．北京：科学出版社，35：112-115.]
KOUZAI Y, MOCHIZUKI S, SAITO A, et al., 2012. Expression of a bacterial chitosanase in rice plants improves disease resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. Plant Cell Rep, 31: 629-636.
MAO GZ, ZHANG HM, SHAO YF, et al., 2012. Screening and identification of chitosanase-producing microorganisms from soil and optimization of the fermentation conditions[J]. Hubei Agric Sci, 56(10): 1913-1917. [毛贵珠，章晔敏，邵一凡，等，2012．产壳聚糖酶土壤微生物的筛选鉴定及发酵条件优化[J]．湖北农业科学，56(10)：1913-1917．]
PANG YJ, 2004. Screening, fermentation conditions and properties of chitosanase[D]. Qingdao: Ocean University of China. [逄玉娟，2004．壳聚糖酶菌株的筛选、发酵条件及酶性质的研究[D]．青岛：中国海洋大学.]
PARK BK, KIM MM, 2010. Applications of chitin and its derivatives in biological medicine[J]. Intl J Mol Sci, 11: 5152-5164.

RADHAKRISHNAN R, HASHEM A, ABD ALLAH EF, 2017. Bacillus: A biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments[J]. Front Physio, 8: 667-680.

MONAGHAN RL, EVELEIGH DE, TEWARI FP, et al., 1973. Chitosanase, a novel enzyme[J]. Nat New Biol, 245(142): 78-80.

RAJULU MBG, THIRUNAVUKKARASU N, SURYANARARAYANAN TS, et al.， 2011. Chitinolytic enzymes from endophytic fungi[J]. Fungal Divers, 47(1): 43-53.

SHAN QS, 2015. Screening of chitosanase-producing strain and study on its enzymatic properties[D]. Changchun: Jilin University. [单秋实，2015．壳聚糖酶高产菌株的筛选及酶学性质的研究[D]．长春：吉林大学.]

THADATHIL N, VELAPPAN, SP, 2014. Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications: A review[J]. Food Chem, 150: 392-399.

VENKATACHALAM A, RAJULU MBG, THIRUNAVUKKARASU N, et al.， 2015. Endophytic fungi of marine algae and seagrasses: A novel source of chitin modifying enzymes[J]. Mycosphere, 6(3): 345-355.

WANG QH, CAI JP, 2000. Screening, identification and incubation conditions of chitosanase producing microorganism[J]. Indust Microbiol, (4): 32-36. [王钦宏，蔡静平，2000．壳聚糖酶生产菌的筛选、鉴定及其产酶培养条件的研究[J]．工业微生物，(4)：32-36.]

WANG YJ, ZHUO SL, CHEN S, et al., 2012. Screening, identification and enzymatic properties of chitosanase-producing strain[J]. Microbiol Chin, 39(12): 1734-1745. [王艳君，卓少玲，陈盛，等，2012．产壳聚糖酶菌株的筛选、鉴定及酶学特性分析[J]．微生物学通报，39(12)：1734-1745．]

WEI JC, 1979. Fungal identification manual[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press. [魏景超，1979．真菌鉴定手册[M]．上海：上海科学技术出版社.]

XIONG YY, XUE YH, CHEN XE, et al., 2018. Cold source plasma mutation and optimization of fermentation conditions for chitosanase high-yield strain[J]. Food Ferm Ind, 44(3): 101-106. [熊妍妍，薛宇航，陈小娥，等，2018．壳聚糖酶高产菌株的冷源等离子体诱变及发酵条件的优化[J]．食品与发酵工业，44(3)：101-106.]

YANG LH, CHENG SW, FENG ZB, et al., 2013. Purification chitosanase from *Streptomyces hygroscpious* and its catalytic properties[J]. Chin J Bioproc Eng, 11(3): 52-58. [杨立红，程仕伟，冯志彬，等，2013．链霉菌壳聚糖酶的纯化及其酶学性质[J]．生物加工过程，11(3)：52-58.]

YOU QH, 2016. Reasearch and development on a chitosanase and preparation of chitooligosaccharides by enzymatic hydrolysis[D]. Nanchang: Jiangxi Normal University.[游清徽，2016．壳聚糖酶的研制及酶法生产壳寡糖[D]．南昌：江西师范大学.]

ZENG J, 2002. Purification and immobilization of chitosanase from *Penicillium* sp. ZDZ1[D]. Hangzhou: Zhejiang University. [曾嘉，2002．青霉属菌株产壳聚糖酶的分离纯化及固定化的研究[D]．杭州：浙江大学．]

ZHANG T, 2005. Purification and characterization of a novel chitosanase from *Metarhizium guizhouense* in solid-state fermentation[D]. Chengdu: Sichuan University. [张涛，2005．产壳聚糖酶真菌的筛选与绿僵菌固态发酵以产壳聚糖酶以及酶的分离纯化和性质研究[D]．成都：四川大学.]

ZHANG X, ZHANG YH, LIU XY, et al., 2018. Optimization of fermentation conditions of the chitosanase-producing strain ncps116 and enzymatic properties of the chitosanase[J]. Chem Ind Eng Prog, 37(6): 2354-2363.[张翔，张彦昊，刘孝永，等，2018．产壳聚糖酶菌株 ncps116

发酵条件优化及其酶学性质[J].化工进展，37(6): 2354-2363.]

ZHANG ZR, 2016. Identification, fermentation and characterization of a marine bacterium Y-116 producing chitosanase[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University. [张子瑞，2016．一株产壳聚糖酶的海洋菌株 Y-116 的鉴定、产酶条件和酶学性质研究[D]．上海：上海海洋大学.]

ZHENG LY, SUI SG, 2004. Screening and mutagenesis of chitosanase-producing strain and study on the optimal conditions of chitosanase formation[J]. J Zhejiang Univ (Eng Sci Ed), 38(8): 106-109. [郑连英，隋斯光，2004．产壳聚糖酶菌株的诱变育种及其产酶条件研究[J]．浙江大学学报(工学版)，38(8)：106-109．]

ZHUO SL, 2012. Screening of chitosanase-producing strain and research on immobilization of chitosanase[D]. Fuzhou: Fujian Normal University. [卓少玲，2012．壳聚糖酶产生菌株的筛选及酶的固定化研究[D]．福州：福建师范大学.]

ZITOUNI M, VIENS P, GHINET MG, et al.，2017. Diversity of family GH46 chitosanases in *Kitasatospora setae* KM-6054[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 101: 7877-7888.